

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

G01N 27/12, 33/543

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/34140

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum: 18. September 1997 (18.09.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/00494

(22) Internationales Anmeldedatum:

12. März 1997 (12.03.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 10 115.8

14. März 1996 (14.03.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HINTSCHE, Rainer [DE/DE]; Schwedter Strasse 14, D-10119 Berlin (DE). PAESCHKE, Manfred [DE/DE]; An der Wildbahn 59, D-16352 Basdorf (DE).

(74) Anwalt: OLGEMÖLLER, Luitgard; Leonhard Olgemöller Fricke, Josephspitalstrasse 7, D-80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

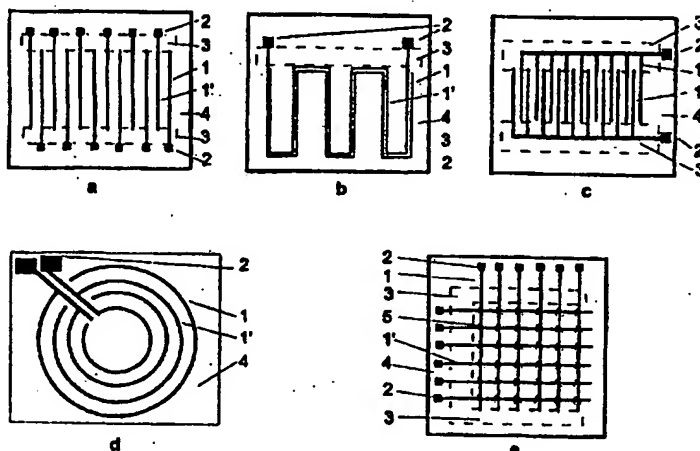
Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: DETECTION OF MOLECULES AND MOLECULE COMPLEXES

(54) Bezeichnung: DETEKTION VON MOLEKÜLEN UND MOLEKÜLKOMPLEXEN



(57) Abstract

The invention concerns a process for detecting molecules or molecule complexes. A measurement probe is brought into contact with an ultra-microelectrode arrangement comprising at least two electrode structures configured in such a way that the distances between the different structures lie in the ultra-micro range; an alternating electrical field is created by application of an electrical potential; and the current or potential fluctuations caused by species present or created in the measurement probe are measured.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Detektieren von Molekülen oder Molekülkomplexen, wobei eine Meßprobe mit einer Ultra-Mikroelektrodenanordnung (1, 1', 2, 3, 4, 5) in Kontakt gebracht wird, welche mindestens zwei Elektrodenstrukturen (1, 1') aufweist, die derartig zueinander angeordnet sind, daß die Abstände zwischen den verschiedenen Strukturen im Ultra-Mikrobereich liegen, durch Anlegen eines elektrischen Potentials ein elektrisches Wechselfeld erzeugt wird und die Strom- oder Potentialveränderungen gemessen werden, die durch in der Meßprobe vorhandene oder entstehende Spezies verursacht werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien | GB | Vereinigtes Königreich | MX | Mexiko |
| AT | Österreich | GE | Georgien | NE | Niger |
| AU | Australien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BB | Barbados | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BF | Burkina Faso | IE | Irland | PL | Polen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BJ | Benin | JP | Japan | RO | Rumänien |
| BR | Brasilien | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| BY | Belarus | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CA | Kanada | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SG | Singapur |
| CG | Kongo | KZ | Kasachstan | SI | Slowenien |
| CH | Schweiz | LI | Liechtenstein | SK | Slowakei |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LR | Liberia | SZ | Swasiland |
| CN | China | LX | Litauen | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| EE | Estland | MG | Madagaskar | UG | Uganda |
| ES | Spanien | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | MN | Mongolei | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MR | Mauritanien | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | MW | Malawi | | |

Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Detektieren von molekularen Spezies sowie einen elektrischen Sensor hierfür.

5 Solche elektrischen Sensoren, auch Ultra-Mikroelektrodenarrays genannt, sind für die chemische Analytik und Prozeßkontrolle auf verschiedenen Gebieten wie Gesundheitswesen, Biotechnologie, Umweltschutz und chemischer Industrie einsetzbar. Sie stellen ein vergleichsweise einfaches Meßsystem dar, das die Bindung
10 oder Anlagerung von Molekülen im elektrodennahen Raum meßbar erfaßt.

Bisher bekannt sind optische Sensoren, die unter anderem nach dem Prinzip der **Evanescent-Wave** [vgl. Feldman, et al., Biosens. & Bioelectron., 10 (1995) 423] oder der **Lichtreflexion** [vgl. Domenici et al., Biosens. & Bioelectron., 10 (1995) 371 oder Brecht, Gauglitz, Biosens. & Bioelectron., 10 (1995), 923] oder der **Surface Plasmon Resonanz** [vgl. Häuseling et al., Langmuir, 7 (1991) 1837 oder U.Jönsson et al., BioTechniques 11 (1991), 620]
15 Bindungseffekte oder die Anlagerung von Molekülen in dünnen Schichten nachzuweisen gestatten.

Für die direkte elektrische Auslesung solcher Bindungsereignisse wurden bereits ein potentiometrisches Meßverfahren [vgl. Bergfeld, Biosens. & Bioelectron., 6 (1991), 55], ein kapazitives Meßverfahren [vgl. Swietlow, Electroanalysis, 4 (1992), 921] und ein impedimetrisches Meßverfahren [vgl. Knichel et al. Sens.&Act. B 28, (1995), 85] beschrieben. Auch Elektrodenanordnungen nach dem EIS-Prinzip (EIS: Elektrolyt-
25 Insulator-Semiconductor) wurden vorgeschlagen [vgl. Schyberg et al. Sens.&Act. B 26-27 (1995) 457 oder Souteyrand et al. Sens.&Act. B 20, (1994) 63], wobei der Isolator als Kopplungs- und Übertragungselement wirkt.

35 Bei diesen elektrochemischen Meßanordnungen dienen räumlich weit voneinander entfernte Elektroden zur Erfassung von Molekülen in der elektrodennahen dünnen Grenzschicht, die aber durch eine vergleichsweise große Menge an Elektrolyten und anderen

Substanzen zwischen den Elektroden in vielfacher Weise negativ beeinflusst werden.

Es wurden auch Anwendungen bekannt, bei denen dünne
5 Molekülschichten als Gate zwischen Drain und Source von Transistoren abgeschieden wurden und Informationen über die organische Schicht liefern [vgl. Kruse et al. Sens.&Act. B 6 (1992), 101 oder Uhe et al. Electroanalysis, 6(7) (1994), 543].

10 Allen diesen beschriebenen elektrischen Verfahren mit Elektroden ist gemeinsam, daß sie keine Anordnungen aufweisen, die molekularen Dimensionen nahekomen; in allen diesen Anwendungen sind die sensortypischen Abmessungen, z.B. zwischen Meß-, Referenz- und Arbeitselektroden, um Größenordnungen von den
15 molekularen Dimensionen entfernt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren mit Hilfe eines elektrischen Sensors vorzuschlagen, das die Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen mit höherer
20 Nachweisempfindlichkeit bei vergleichsweise geringerem Systemaufwand ermöglicht.

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist in Anspruch 1
umschrieben. Die weiteren Ansprüche zeigen bevorzugte
25 Ausgestaltungen auf.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen mit einer Anordnung durchgeführt, die Ultramikroelektrodenarrays aufweist, deren Elektrodenstrukturen
30 so eng beieinander angeordnet werden, daß sie der Größe großer Molekülkomplexe, z. B. von Immunoproteinen oder DNS-Molekülen, nahekomen. Benutzt wird insbesondere der Effekt, daß sich zwischen nahe benachbarten Elektroden elektrische Wechselfelder erzeugen lassen und der resultierende Strom hauptsächlich von
35 den detektierten Molekülen und Molekülkomplexen im elektrodennahen Raum beeinflusst wird. Die Form und Feinstruktur der Elektroden ist dabei relativ frei wählbar, während die minimale Entfernung der Elektroden selbst typischerweise 3 µm,

bevorzugt 1 μm unterschreiten sollte.

Die Beeinflussung kann durch Diffusion, durch Anlagerung oder Bindung der zu messenden Spezies erfolgen. Durch diese Art der Felderzeugung und Messung mit Hilfe insbesondere der Impedanzspektroskopie erreicht man erfindungsgemäß, daß Elektrolyt-Moleküle sowie andere Substanzen in einer Meßprobe das zwischen den Elektroden anliegende elektrische Feld nur geringfügig beeinflussen und somit die Messung nicht stören.

Eine mehrfache Anordnung dieser Art feinstrukturierter Ultramikroelektrodenarrays führt in vorteilhafter Weise zur Verstärkung des eben beschriebenen Effekts, in dem mit geeigneter Meßtechnik, (z. B. Impedanzmeßbrücken) sequentiell oder parallel gleichartige Messungen realisiert werden. Die Ultramikroelektrodenarrays können aus dünnen Schichten von Edelmetallen wie Gold, Platin oder Iridium oder auch Kohlenstoffmaterialien bestehen oder diese Materialien enthalten (Anspruch 16). Sie werden besonders vorteilhaft auf planare isolierende Trägermaterialien wie Siliziumverbindungen, Glas, Keramik oder organische Polymere aufgebracht, können aber auch zur Planarisierung und mechanischen Stützung in diese Materialien eingegraben oder eingelegt sein (Anspruch 17). Die optimale Annäherung zweier voneinander isolierter Ultramikroelektroden läßt sich, wie in Fig. 1 dargestellt, z.B. durch Bänder oder parallele Streifen oder mäanderförmige und runde oder schneckenartige Strukturen wie auch durch fingerartige Interdigitalanordnungen in Abständen von bevorzugt $<1 \mu\text{m}$ erreichen. In Fig. 1 sind dazu Anordnungsbeispiele a bis d ausgeführt (siehe unten). Die Elektroden sind vorzugsweise zum Meßraum hin nicht abgedeckt.

Als eine besondere Ausgestaltung der Anordnung der Ultramikroelektrodenarrays kann vorgesehen sein, daß man ein Elektrodenarray mit einem zweiten oder mehreren überlagert und die Kreuzungspunkte durch Isolationsschichten voneinander isoliert (Anspruch 19). Auf diese Weise können Elektroden in Abständen von nur noch wenigen nm voneinander angeordnet werden,

wobei die Isolationsschicht die minimale Entfernung definiert (Fig. 1e). Allen Anordnungen der Ultra-Mikroelektrodenarrays gemeinsam ist, daß sie gut voneinander isoliert sein müssen, damit zwei, drei oder noch mehr Ultramikroelektrodenarrays durch isolierte Zuleitung auf dem Chip elektrisch unabhängig einzeln oder in Gruppen mit Gleich- und/oder Wechselstrom beaufschlagt werden können (Anspruch 20). Die für die Isolierung eingesetzten Werkstoffe (z.B. Kunststoffe oder anorganische Verbindungen wie Siliciumoxide, -nitride und keramische Materialien) müssen über den Nutzungszeitraum inert gegenüber den in der Probe verwendeten Verdünnungs- oder Lösungsmitteln (häufig Wasser) sein. Unter "Lösungsmittel" sind Reaktionsflüssigkeiten zu verstehen, in denen eine Molekülbindung, eine -anlagerung oder eine -diffusion möglich ist. Die Meßprobe muß jedoch nicht zwingend flüssig sein, auch andere Zustände sind möglich. So können die zu messenden Vorgänge auch in einem Gel ablaufen.

Zwischen den Ultramikroelektroden kann das zur Detektion benutzte elektrische Feld durch Wechselstrom mit Frequenzen zwischen 1 MHz und 10 MHz und Amplituden zwischen ca. 10 mV und 50 mV erzeugt werden. Dabei werden Potentiale zwischen 0 V und +/-5 V gewählt.

Das vorliegende Verfahren ermöglicht die Erfassung auch komplexer Reaktionsabläufe und bietet daher erweiterte Einsatzmöglichkeiten. Das Eindringen von Molekülen in den elektrodennahen Bereich mit dem aufgebauten Feld (z.B. durch Diffusion) oder die Anordnung von Molekülen in diesem Bereich, die z.B. durch sog. "self assembling" oder auch durch Komplexbildung geschehen kann, verändern sowohl die realen als auch die imaginären Größen der komplexen Impedanz und können zeitunabhängig - z.B. nach Abschluß der Ereignisse -, bei Bedarf ebenso wie der Phasenwinkel aber auch zeitabhängig, d. h. vom Fortgang des Bindungsereignisses oder der Diffusion abhängig, gemessen werden (Ansprüche 3 und 4). Für ein komplettes Impedanzspektrum wird der gesamte Frequenzbereich vermessen und ausgewertet. Besonders vorteilhaft ist die erfindungsgemäße Nutzung nur einzelner ausgewählter Frequenzen oder

Frequenzbereiche, die maximal beeinflußt werden. Dadurch gelingt es, miniaturisierte Nachweissysteme zu konstruieren.

Bei der Nutzung der Ultramikroelektrodenarrays in Flüssigkeiten oder dergleichen ist es auch möglich, zusätzlich zum Meßvorgang - oder aber in Meßpausen - Gleichstromanteile zu überlagern oder zu applizieren (Anspruch 6). Diese können z.B. elektrochemische Reaktionen wie Oxidationen oder Reduktionen von elektrisch aktiven Molekülen induzieren, wobei solche Vorgänge simultan oder sequentiell mit den Impedanzmessungen gemessen werden (Anspruch 7). Erfindungsgemäß ist dadurch eine Kombination elektrischer und elektrochemischer Messungen mit derselben Sensor-Anordnung (Ultramikroelektrodenarray) möglich.

Erfindungsgemäß kann das Verfahren zur Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen ausgeführt werden, indem man die Moleküle, die man messen will, auf den Mikroelektrodenflächen selbst bindet. Diese Bindung kann eine physikalische (Adsorption) oder eine chemische sein. Für letztere eignen sich besonders gut die bekannten Verfahren der Selbstanordnung (englisch "self assembling" genannt), die es gestatten, z. B. monomolekulare Thiolverbindungen auf Goldelektroden zu binden und zu messen. Dieses Verfahren ist universell für eine große Zahl von Molekülen anwendbar, nicht nur für solche, die eine Thiolgruppe besitzen oder damit versehen werden können.

Ein zweites selektives Verfahren zur Anheftung von Molekülen oder Molekülkomplexen an die leitenden Mikroelektroden-Oberflächen ist die bekannte Methode der Elektropolymerisation (Anspruch 9). Dabei kann jede Elektrode individuell, in Gruppen oder parallel auf ihrer Oberfläche mit Elektropolymeren, z. B. aus den monomeren Molekülen Streptavidin, Pyrrol, Anilin, Vinylferrocen oder anderen elektrisch polymerisierbaren Substanzen, modifiziert werden. Die Bindung solcher Verbindungen in monomolekularen oder multimolekularen Schichten auf den Elektroden verändert das Impedanzspektrum oder einzelne Frequenzen in sehr charakteristischer Weise und läßt sich damit zeitabhängig oder nach Abschluß der Reaktion messen.

Weiterhin lässt sich das Impedanzspektrum auch dadurch meßbar verändern, daß man die Moleküle anstatt auf den Elektroden in den Elektrodenzwischenräumen positioniert (Anspruch 10). Diese Positionierung kann zum Beispiel durch chemische Bindungen (so z.B. an Siliciumdioxid) oder durch Adhäsion oder durch Reaktionen wie Kondensationsreaktionen, z.B. Silanisierungen, erfolgen. Zur Beschichtung der Gesamtflächen des Elektrodenarrays, also der Elektroden selbst wie auch der Elektrodenzwischenräume, kann man das bekannte Langmuir-Blodgett Verfahren heranziehen (Tachibana Matsumoto, Advanced Materials Ab. 11 (1993), 5/796-803), mit dem z. B. Lipide oder Phthalocyanine durch Aufziehen von monomolekularen Filmen in Schichten angeordnet werden können.

Einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Detektion von Molekülen und Komplexen gemäß kann die Konzentration von Molekülen in der elektrodennahen Schicht durch Diffusion verändert und die Änderung gemessen werden. Dies lässt sich sowohl mit Hilfe chemisch/physikalisch bedingter Konzentrationsänderungen als auch durch das Anlegen eines elektrischen Potentials, das einen Diffusionsgradienten erzeugt, erreichen. Weiterhin ist es möglich, die Produktion spezifischer Moleküle, beispielsweise durch Enzyme, in Elektrodennähe zu bewirken und zu messen.

Erfindungsgemäß umfaßt das Verfahren zur Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen in einer bevorzugten Ausgestaltung die Maßnahme, daß die zuvor auf den Elektrodenarrays erzeugten Molekül-Schichten mit chemischen Haftgruppen versehen sind oder werden, die durch eine chemische Reaktion oder eine Komplexbildung weitere Moleküle binden können (Anspruch 11). Es gelingt dabei, mit hoher Empfindlichkeit derartige Bindungsereignisse zu verfolgen. Wenn beispielsweise ein niedermolekularer Komplexbildner wie Biotin über eine Thioolfunktion an die Elektrode gebunden wird, kann dieser ausschließend mit einem höhermolekularen Komplexbildungspartner, z.B. Streptavidin, an welches beliebige weitere Moleküle

gebunden sein können, komplexiert werden.

Eine besonders wichtige und sehr breit einsetzbare Anwendung des vorliegenden Verfahrens ist die Immunodetektion (Anspruch 12).

- 5 Dabei wird der Aufbau von Molekülschichten auf dem Ultramikroelektrodenarray nach dem Sandwich-Prinzip einer Antikörper/Antigen-Immunoreaktion vorgenommen. Zum Nachweis von Antikörpern in der Meßprobe kann man dafür beispielsweise Haptene (niedermolekulare Antigene) oder andere Antigene (häufig
10 Proteine) an die Mikroelektrodenarrays binden. Durch die spezifische Komplexbildung zwischen den fest verankerten Antigenen und den in der Meßprobe befindlichen Antikörpern gelingt auf diese Weise ein spezifischer Antikörpernachweis. In Umkehrung dieses Prinzips kann man auch die Antikörper auf den
15 Elektroden binden und Haptene oder dergleichen aus der Meßprobe detektieren. Das Antigen kann auch ein höhermolekulares Virus-Protein sein, das am Mikroelektrodenarray fest gebunden ist und Antikörper aus der Meßprobe zu messen gestattet. Varianten dieses Verfahrens sind der Einsatz von multivalenten
20 Antikörpern, mit denen drei- oder mehrfache Molekülkomplexe konstruiert und gemessen werden können.

- Eine weitere Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gegeben, daß man das Ultramikroelektrodenarray zur
25 elektrischen Auslesung von Hybridisierungsvorgängen in der Nucleinsäurechemie einsetzt (Anspruch 13). Applikationen in der Gentechnologie lassen sich dann dadurch realisieren, daß man Nucleotide über Thiolbindungen oder dgl. an die Elektrodenstrukturen koppelt und die Bindung komplementärer
30 Nucleinsäure-Bausteine durch das erfindungsgemäße Verfahren erfaßt. Diese Detektion läßt sich dadurch variieren, daß man zusätzliche Anlagerungen von Nucleinsäuren, z. B. zur Triple-DNS oder die zusätzliche Einlagerung komplexierender Moleküle in Doppel- oder Triple-Helices als Bindungsereignis einer Messung
35 zugänglich macht (Anspruch 14). Für diese Komplexierung oder Einlagerung können vorteilhafterweise auch Metallkomplexe genutzt werden, die das elektrodennahe Feld elektrisch besonders intensiv verändern.

Das Meßprinzip und die Veränderung des elektrischen Feldes gestattet es prinzipiell, die Molekülstruktur und -art mittels einer quantitativen Analyse des Impedanzspektrums zu unterscheiden. Eine Differenzierung nach der Art und Größe der Moleküle ist durch die quantitative Auswertung und insbesondere durch die Eichung der Impedanzspektren mit bekannten Molekülspezies möglich.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand mehrerer Figuren und einem Beispiel erläutert.

- Figur 1 zeigt mögliche Anordnungen der
5 Ultramikroelektrodenarrays;
Figur 2 zeigt die Adsorption von SH-Biotin;
Figur 3 zeigt Nyquist-Plots einer mit SH-Biotin modifizierten
und einer zusätzlich mit Streptavidin komplexierten
Elektrode;
10 Figur 4 zeigt den amperometrischen Nachweis von p-Aminophenol.

Figur 1 zeigt verschiedene mögliche Anordnungen von Ultramikroelektrodenarrays. Dabei ist

- 1a eine streifenförmige parallele Anordnung;
15 1b eine mäanderförmige parallele Anordnung;
1c eine fingerartige interdigitale Anordnung;
1d eine kreisförmige parallele Anordnung;
1e eine kreuzförmig gestapelte und voneinander isolierte
Anordnung;

20

Der Anordnung der Figur 1d sehr ähnlich ist die Anordnung der Elektroden als parallel verlaufende Schnecke.

- Die voneinander isolierten Ultramikroelektroden 1 und 1' mit
25 ihren Kontakten zur elektrischen Verbindung 2 sowie den
Isolationsschichten (z.B. Siliciumnitrid) 3 auf dem Chip sind
auf einem planaren Träger (z.B. ein Siliciumchip) 4 angeordnet.
Bei der mehrlagigen Anordnung der Figur 1e wird durch eine
Zwischenisolierung 5 die Elektrodenoberfläche 1 von der
30 Elektrodenoberfläche 1' isoliert.

Ausführungsbeispiel

- Ein interdigitales Goldelektrodenarray, strukturiert nach
35 Figur 1c, besitzt eine Elektrodenbreite von 1 μm und einen
Elektrodenabstand von 0.7 μm . Die Elektroden werden mit einer 1
ml, 10 mmol/l SH-Biotin-Lösung mittels Self Assembling
modifiziert.

In Figur 2 ist die Adsorption von 10 mmol/l SH-Biotin in einer 0.1 mol/l Natriumpufferlösung als Kapazitäts-Zeit-Verhalten bei einem angelegten Potential von 50 mV und einer zusätzlich
5 aufgeprägten Amplitude von 10 mV an einem Paar interdigitaler Goldelektroden dargestellt. Die Kapazität der Elektrode erniedrigt sich nach einer Zugabe von SH-Biotin in die Lösung. Nach ca. 2000 Sekunden ist die Goldoberfläche vollständig mit -S-Biotin bedeckt. Nach 10 min. Waschen der Elektrode in 0.1
10 mol/l Natriumpufferlösung wird in einem nachfolgenden Schritt die adsorbierte monomolekulare Molekülschicht mit Streptavidin durch Eintauchen der modifizierten Elektrode für 2 Stunden in eine 50 U/ml Lösung komplexiert. Nach der β -Galactosidase-Streptavidin Modifizierung wurde die Elektrode 10 min in 0.1
15 mol/l Natriumpufferlösung gespült und anschließend in eine Meßzelle gespannt.

Figur 3 zeigt sogenannte Nyquist-Plots bei einem Potential von 50 mV, einer Amplitude von 10 mV und einem Frequenzbereich
20 zwischen 2×10^{-3} Hz und 1×10^6 Hz, gemessen als Zweipol-Impedanz. Kurve I repräsentiert die mit SH-Biotin modifizierte Elektrode, Kurve II die gleiche Elektrode nach zusätzlicher Komplexierung des SH-Biotin mit β -Galactosidase-Streptavidin. Die Änderung der Impedanz zeigt die Störung des Dielektrikums zwischen den
25 Elektroden durch das komplexierte Molekül und repräsentiert außerdem eine vollzogene Bindung zwischen dem Biotin und dem Streptavidin-Enzym-Komplex.

Das Enzym β -Galactosidase am Streptavidin wird unabhängig als
30 kombinierter amperometrischer Nachweis der Bindung des β -Galactosidase-Streptavidins an das SH-Biotin genutzt. Dieser Nachweis wird mit der Funktion der β -Galactosidase, der enzymatischen Umsetzung von 5 mmol/l p-Aminophenyl- β -D-Galactopyranoside (p-APG) zu p-Aminophenol, über eine
35 amperometrische Oxidation-Reduktion des p-Aminophenols durchgeführt.

Figur 4 zeigt den amperometrischen Nachweis von p-Aminophenol an den gleichen Elektroden mit einem Oxidationspotential von 250 mV und einem Reduktionspotential von -50 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode, nach Zugabe von 5 mmol/l p-APG in 0.1 mol/l Natriumpufferlösung in die Meßzelle. Die kontinuierliche Umsetzung von p-APG zu p-Aminophenol, welches durch den linearen Anstieg des Stromes repräsentiert wird, zeigt an, daß das Enzym die p-Aminophenolkonzentration in der Meßkammer erhöht.

Ansprüche:

1. Verfahren zum Detektieren von Molekülen oder Molekülkomplexen, wobei
 - eine Meßprobe mit einer Ultra-Mikroelektrodenanordnung in Kontakt gebracht wird, welche mindestens zwei Elektrodenstrukturen aufweist, die derartig zueinander angeordnet sind, daß die Abstände zwischen den verschiedenen Strukturen im Ultra-Mikrobereich liegen,
 - durch Anlegen eines elektrischen Potentials ein elektrisches Wechselfeld erzeugt wird und
 - die Strom- oder Potentialveränderungen gemessen werden, die durch in der Meßprobe vorhandene oder entstehende Spezies verursacht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Feldveränderungen mit Hilfe der Impedanzspektroskopie gemessen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin die Verstimmung des elektrischen Feldes, die durch in der Meßprobe vorhandene oder entstehende Spezies entsteht, durch die Messung der kapazitiven und/oder der resistiven Anteile und/oder des Phasenwinkels zeitunabhängig oder zeitabhängig gemessen wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Detektion der Moleküle oder Molekülkomplexe anhand ihrer Bindung oder Anlagerung oder Diffusion erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mehrere Elektrodenanordnungen überlagert angeordnet und die Kreuzungspunkte durch Isolationsschichten voneinander isoliert sind und die Messung sequentiell, parallel oder simultan erfolgt.

- 6 Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das elektrische Wechselfeld mit einem Gleichstromanteil überlagert oder angeregt wird.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei in der Meßprobe amperometrische Oxidationen oder Reduktionen oder Redox-Recycling von Molekülen mit elektrisch aktiven Gruppen oder von Redox-Mediatoren gemessen werden.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin zu messende Spezies sich auf den aktiven Elektrodenflächen selbst anordnen und in gebundenem Zustand gemessen werden.
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin Moleküle auf den Elektrodenflächen durch Elektropolymerisation gebunden und in gebundenem Zustand gemessen werden.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei Moleküle in den Elektrodenzwischenräumen und/oder auf der Gesamtoberfläche der Elektroden durch physikalische oder chemische Bindung fixiert und gemessen werden.
- 25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10 wobei eine erste fixierte Molekülschicht eine Haftgruppe enthält, die selbst oder durch ein bifunktionelles Reagenz eine zweite Molekülschicht und diese gegebenenfalls weitere bindet und diese Ereignisse oder ihre Umkehr gemessen werden.
- 30 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin die erste Molekülschicht komplexbindende Gruppen enthält, die ihren komplementären Bindungspartner binden, wobei diese Ereignisse oder ihre Umkehr gemessen werden.
- 35 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, worin die erste Molekülschicht ein Desoxyribonukleinsäure- oder ein Ribonukleinsäurebaustein ist, der durch Hybridisierung einen komplementären Molekülstrang bindet, wobei dieses Ereignis oder seine Umkehr gemessen werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Molekulanordnung einen weiteren Nucleinsäurebaustein oder ein komplexierendes oder einlagerndes Molekül bindet und dieses Ereignis oder seine Umkehr gemessen wird.
- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin die Moleküle oder Molekülkomplexe detektiert werden, indem sie nach Größe und/oder Art unterschieden werden.
- 10 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, worin die aktiven Elektrodenflächen aus Gold, Platin, Iridium oder anderen Edelmetallen, aus Kohlenstoffmaterialien oder aus anderen leitenden Materialien oder aus Kombinationen hieraus bestehen.
- 15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, worin die Elektroden auf Siliciumverbindungen, Glas, Keramik, organische Polymere oder andere isolierende Materialien, aufgebracht oder darin eingelegt sind.
- 20 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin die Elektroden durch Beschichtung auf einem Substrat oder Einbettung in ein solches als Bänder oder Streifen oder kreisförmige Strukturen oder interdigitale Anordnungen im Mikrometer- oder Submikrometerabstand zueinander angeordnet sind.
- 25 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, worin die Elektroden zumindest teilweise als mehrlagige und voneinander isolierte und ggf. sich kreuzende Strukturen angeordnet sind.
- 30 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, worin die aktiven Elektrodenflächen über isolierte Zuleitungen und/oder elektronische Komponenten einzeln oder in Gruppen mit Gleich- und/oder Wechselstrom beaufschlagt werden können.
- 35

* * *

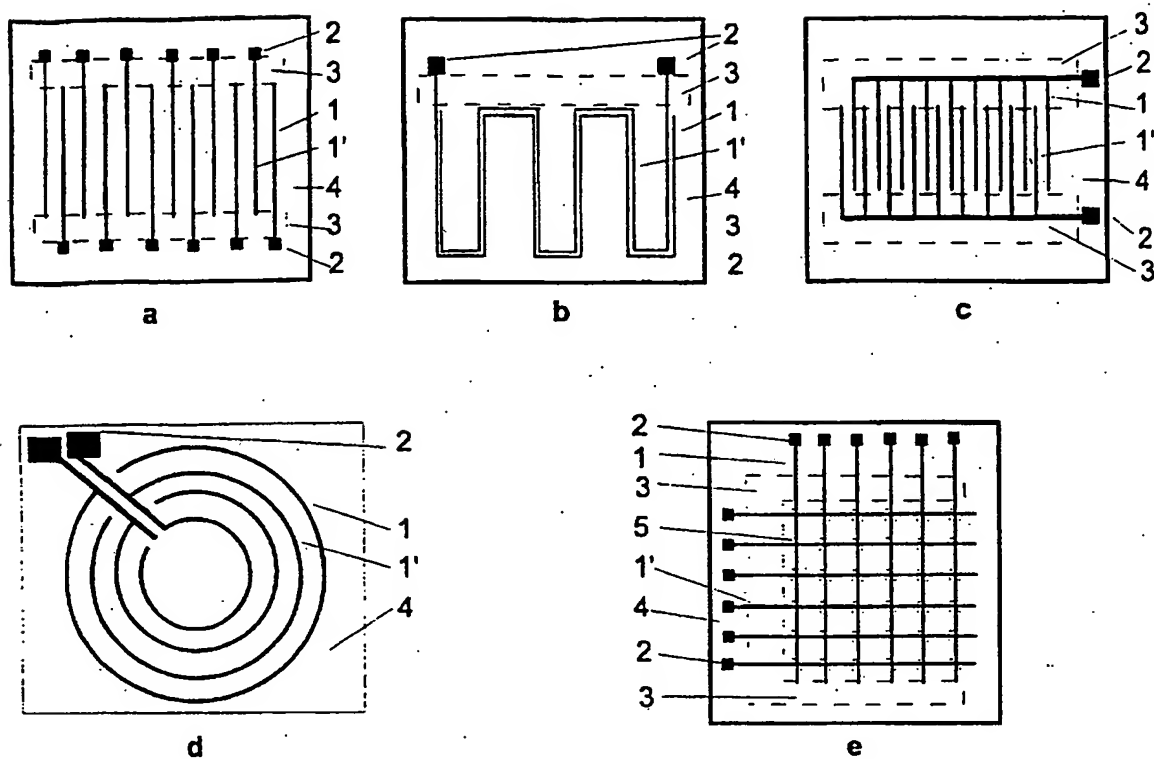


Fig. 1

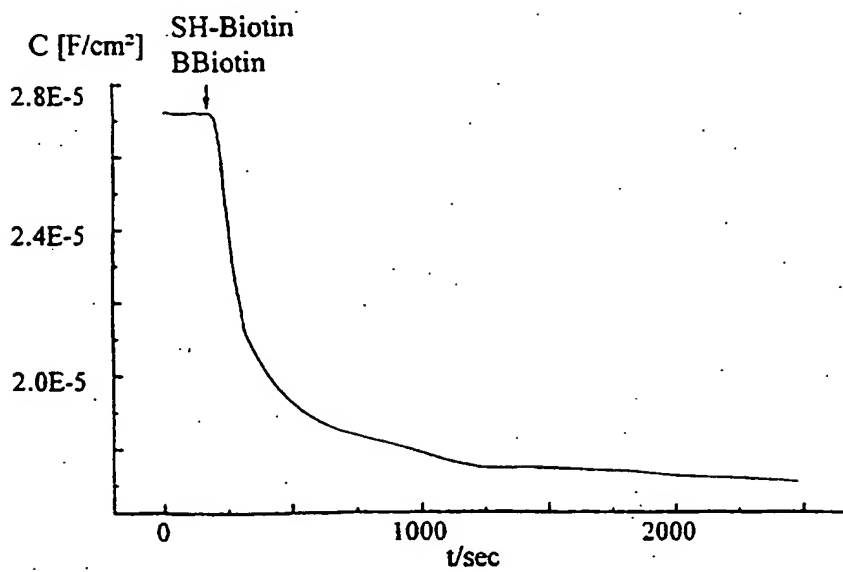


Fig. 2

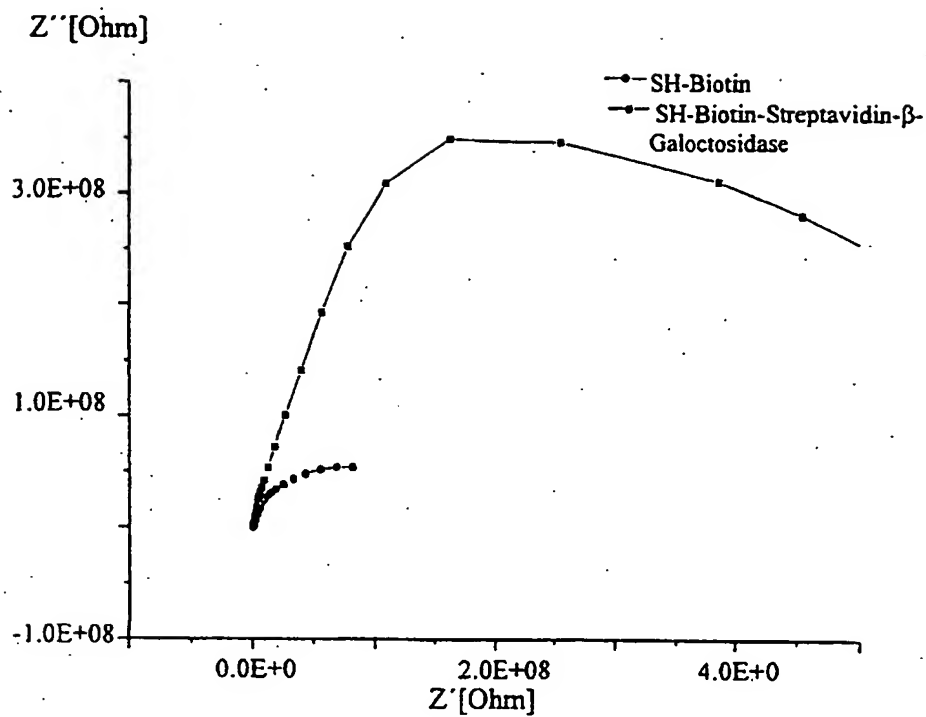


Fig. 3

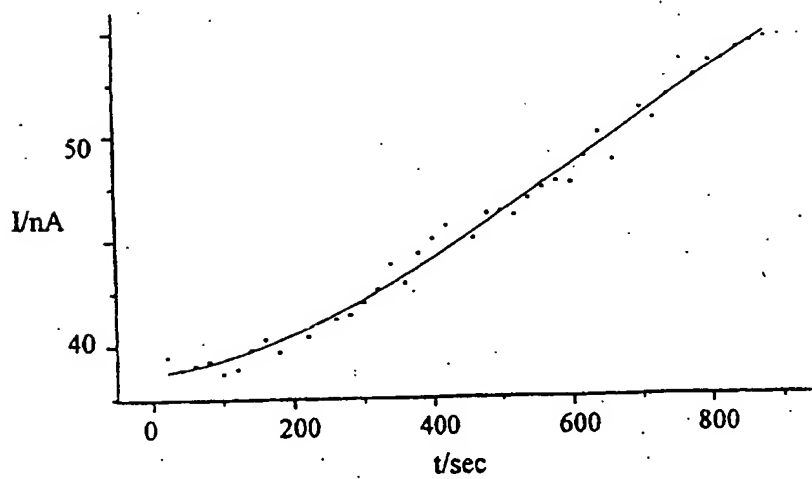


Fig. 4